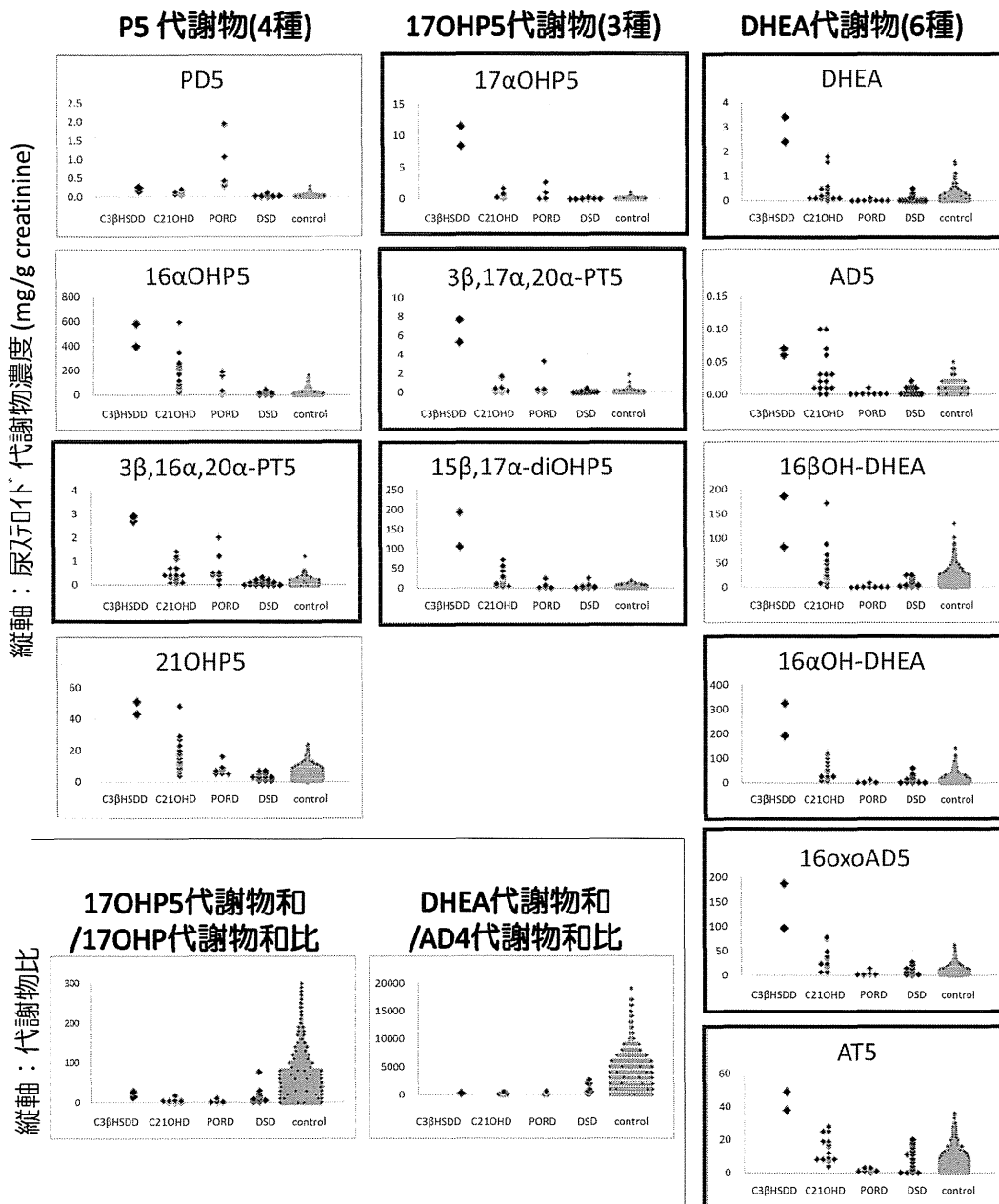


【図3】 Δ5ステロイド代謝物およびΔ5代謝物と/Δ4代謝物と比の分布

□ = C3βHSDD とその他の疾患3群の間に重複のなかった項目



MC2R遺伝子異常による先天性ACTH不応症3例の検討

分担研究者 勝又 規行 国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部 基礎内分泌研究室長

【研究要旨】

本邦のMC2R遺伝子異常に起因する先天性ACTH不応症では、MC2R変異のホットスポットはあるいは創始者効果は認められない。生直後から低血糖症状を示す例や、過成長を示す例が存在する。

A. 研究目的

先天性ACTH不応症は、副腎のグルココルチコイドの分泌不全がみられるが、ミネラルコルチコイドの分泌は保たれており、外因性のACTHには反応しない稀な疾患である。本症は常染色体劣性遺伝性疾患であり、その責任遺伝子として、ACTH受容体をコードするMC2R遺伝子（1型）、melanocortin 2 receptor accessory proteinをコードするMRAP遺伝子（2型）などが知られている。われわれは、本邦の先天性ACTH不応症の3家系3例でMC2R遺伝子変異を同定したので報告する。

B. 研究方法

対象：MC2R遺伝子変異を同定した3家系3症例（男1例、女2例）（表1）。

MC2R遺伝子の解析：MC2R遺伝子のエクソンをPCR法で増幅し、PCR産物の塩基配列を直接シーケンス法で決定した。

変異ACTH受容体の機能解析：野生型および変異MC2R cDNAをpcDNA3.1 Zeo(-)プラスミドにクローニングした。マウス副腎由来細胞株Y1の変異株で、ACTH受容体を発現していない細胞株OS3に、各プラスミドをエレクトロポレーション法で導入した。Zeocin耐性を指標

に、野生型および変異ACTH受容体を恒常的に発現する細胞を選択した。野生型および変異MC2R mRNAの発現はノーザンブロット法で検討した。これら細胞にACTH(1-24)を添加し、添加後の細胞内cAMPの産生量をRIAで測定した。

臨床的解析：臨床情報を後方視的に解析した。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析研究は、施設の倫理審査委員会で承認された説明書・同意書を用いて同意を得た後に行った。

C. 研究成果

MC2R遺伝子解析：症例1はp.R137W変異とp.R146H変異の複合ヘテロ接合体、症例2はp.D103N変異のホモ接合体、症例3はp.G226R変異のホモ接合体であった（図1）。

変異ACTH受容体の機能：野生型あるいはp.G226R変異ACTH受容体を恒常的に発現するOS3細胞において、MC2R mRNAの発現量は同等であった（図2A）。p.G226R変異ACTH受容体発現OS3細胞のACTH(1-24)刺激に対するcAMPの産生量は、野生型ACTH受容体発現細

胞に比し、著しく低下していた (図2B)。

臨床的解析：家族歴で、3家系のうち、1家系で近親婚が認められた (表1)。

副腎不全の発症時期および症状としては、出生直後に、低血糖、色素沈着が認められた例が2例、6歳時に色素沈着が認められ診断に至った例が1例であった。6歳時に診断された1例では過成長を認めた (表1)。

血糖は、出生直後に発症した2例で低値、6歳時に発症した1例では正常であった。血清Na、K、Clは全例で正常であった (表1)。

全例で血中ACTHは高値、コルチゾールは低値であった。全例で血中アルドステロンは正常であった。血漿レニン活性 (PRA) は2例で測定されており、軽度高値であった (表1)。ACTH負荷試験で、血中コルチゾールは全例無反応であった。

D. 考察

3家系3例で同定されたMC2R遺伝子変異は各家系に固有であり、変異のホットスポットあるいは創始者効果は認められない。

症例1で同定されたp.R137W変異、p.R146H変異、症例2で同定されたp.D103N変異は、既報変異であり、先天性ACTH不応症の原因と考えられる。

症例3で同定されたp.G226R変異は新規変異である。本変異の意義を検討するために、野生型およびp.G226R変異ACTH受容体を恒常的に発現するOS3細胞を作成した。両細胞においてMC2R mRNA発現量は同等であった。一方、p.G226R変異ACTH受容体発現OS3細胞のACTH(1-24)刺激に対するcAMP産生量は、野生型受容体発現細胞に比し、著しく低下していた。したがって、MC2R遺伝子のp.G226R変異は、症例3のACTH不応症の原因である。

MC2R遺伝子異常に起因する先天性ACTH不

応症では、出生直後から低血糖症状を示すことがあるので、早期診断、早期治療が重要と考えられる。血清電解質が正常でもPRAが軽度上昇することがあるので、診断時に注意が必要である。また、これまでの報告と同様に、過成長が、診断の一助になる。

E. 結論

本邦のMC2R遺伝子異常に起因する先天性ACTH不応症では、1) MC2R遺伝子変異のホットスポットはあるいは創始者効果は認められない。2) 新規p.G226R変異は先天性ACTH不応症の病因である。3) 出生直後から低血糖症状を示すことがある。4) 過成長を示す例が存在する。

F. 研究発表

学会発表

Katsumata N, Mizuno H, Fujiwara I, Ogawa E. Spontaneous pubertal presentation in a 46,XX patient with cholesterol side-chain cleavage enzyme deficiency. 95th Annual Meeting of the Endocrine Society, San Francisco, CA, USA, June 15-18, 2013.

勝又規行, 水野晴夫, 藤原幾磨, 小川英伸. 自然に思春期が発来したコレステロール側鎖切断酵素欠損症の女児例. 第86回日本内分泌学会学術総会、仙台、4月25-27日、2013.

佐藤直子, 内木康博, 堀川玲子, 勝又規行, 田中敏章. 中枢性男性性腺低下症における長期治療経過. 第86回日本内分泌学会学術総会、仙台、4月25-27日、2013.

西垣五月, 高橋千恵, 山本晶子, 水野祐介, 宮下健悟, 内木康博, 品川隆, 勝又規行, 堀川玲子. 新生児マス・スクリーニングにおける17 α -hydroxyprogesterone (17OHP) 軽度から中等度高値症例の解析. 第86回日本内分泌学会

学術総会、仙台、4月25-27日、2013.

小笠原敦子, 田中敏章, 勝又規行, 堀川玲子, 浦上達彦, 佐藤真理. アロマターゼ阻害薬 (anastrozole) による治療で成人身長に達した testotoxicosis の一例. 第47回日本小児内分泌学会学術集会、東京、10月10-12日、2013.

佐藤直子, 勝又規行, 内木康博, 深見真紀, 堀川玲子, 緒方勤, 田中敏章. ゴナドトロピン補充療法に対する先天性中枢性男性性腺機能低下症患者の長期治療成績と治療効果. 第18回日本生殖内分泌学会、東京、12月7日、2013.

G. 謝辞

本研究にご協力いただいた茅ヶ崎市立病院小児科・永瀨茂夫先生、小田洋一郎先生、石田クリニック・石田允先生、兵庫県立淡路病院小児科・中村豊先生に深謝いたします。また、OS3細胞を供与してくださったToronto大学のSchimmer教授に深謝します。

表1. 対象としたACTH不応症患者3例の臨床所見

	症例1 ^{1,2)}	症例2 ³⁾	症例3
性別	男	女	女
MC2R変異	p.R137W/p.R146H	p.D103N/p.D103N	p.G226R/p.G226R
近親婚	なし	なし	あり
在胎週数	40週	39週	40週
出生時体重	3200 g	2450 g	3030 g
副腎不全			
発症時年齢	6歳2ヵ月	出生時	出生時
発症時症状	色素沈着	呼吸困難,チアノーゼ 色素沈着,低血糖	色素沈着,低血糖
発症時身長	125.5 cm (+2.3SD)	47.0 cm (-0.6SD)	48.5 cm(+0.05SD)
発症時体重	21.5 kg	2450 g	3030 g
検査所見			
血糖	72 mg/dl	17 mg/dl	32 mg/dl
血清Na	141 mEq/l	138 mEq/l	137 mEq/l
K	4.2 mEq/l	6.6 mEq/l	4.1 mEq/l
Cl	107 mEq/l	98 mEq/l	106 mEq/l
血中			
ACTH	520 pg/ml	1240 pg/ml*	>1000 pg/ml
17 α -OHP	0.1 ng/ml	—	0.7 ng/ml
Cortisol	<1.0 μ g/dl	1.0 μ g/dl**	1.9 μ g/dl
Aldosterone	31 pg/ml	69 pg/ml**	100 pg/ml
PRA	18 ng/ml/h	—	22 ng/ml/h
Testosterone	0.3 ng/ml	—	<0.2 ng/ml

1) 永渕茂雄, 他. ホルモンと臨床 38:443-446, 1990.

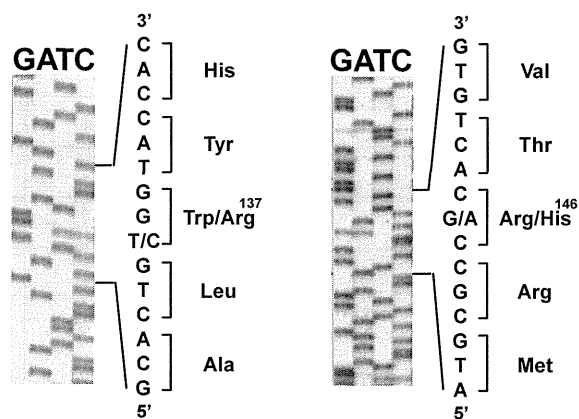
2) 勝又規行, 他. ホルモンと臨床 38:955-958, 1998.

3) 石田允, 他. 日本新生児学会雑誌 14:232-237, 1978.

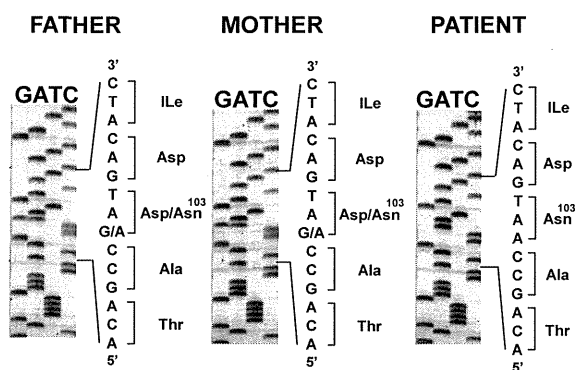
*月齢15ヵ月, hydrocortison投与中止48時間後.

**月齢9ヵ月, hydrocortison補充療法前.

A



B



C

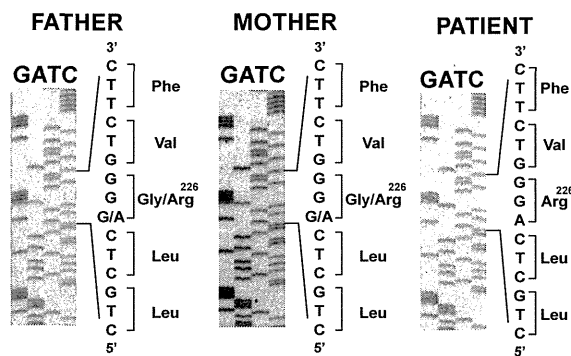


図1. MC2R遺伝子解析. A, 症例1のMC2R遺伝子解析. 症例1はp.R137W変異とp.R146H変異の複合ヘテロ接合体である。B, 症例2と両親のMC2R遺伝子解析. 症例2はp.D103N変異のホモ接合体である。C, 症例3と両親のMC2R遺伝子解析. 症例3はp.G226R変異のホモ接合体である。

A.

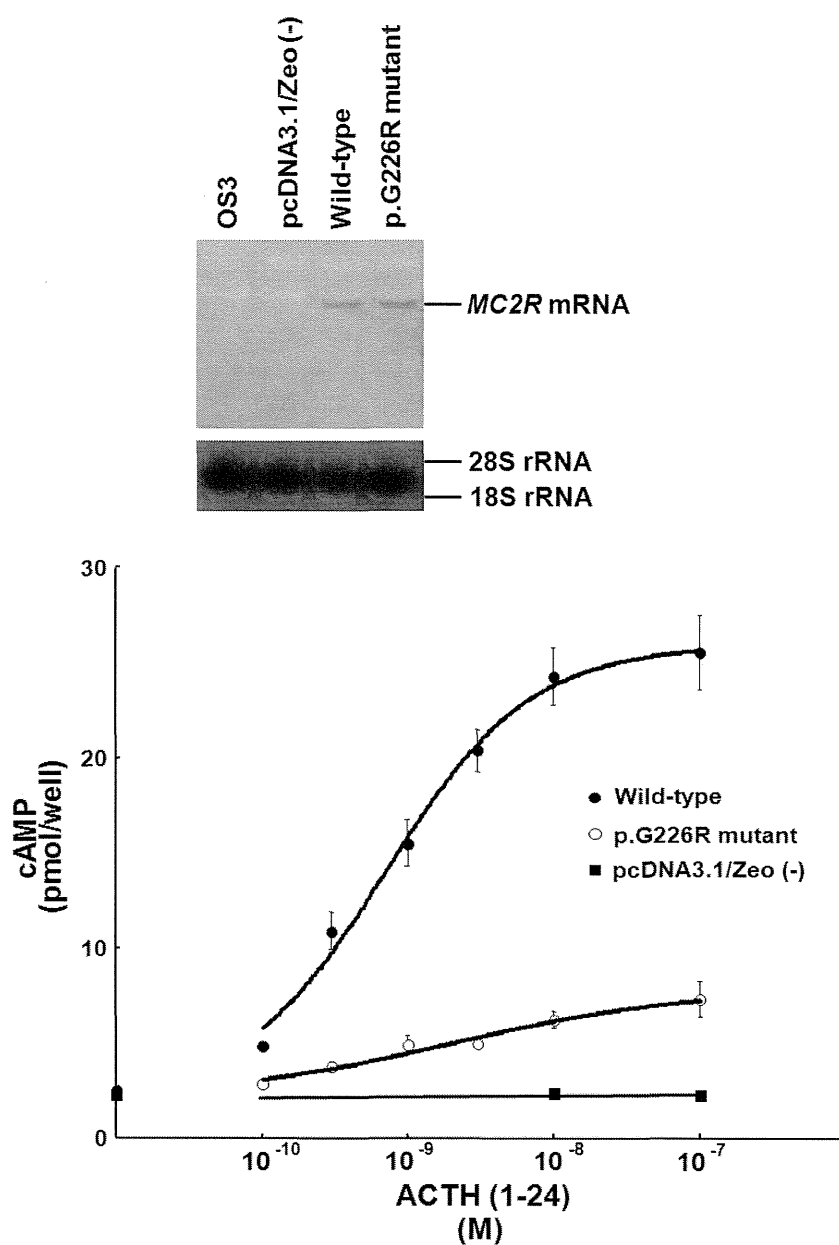


図2. p.G226R変異ACTH受容体の機能解析. A, ノーザンブロット解析. 野生型およびp.G226R変異ACTRH受容体を恒常的に発現させたOS3細胞では同等のMC2R mRNAの発現が見られる。B, ACTH(1-24)刺激に対する用量反応曲線. p.G226R変異ACTH受容体発現OS3細胞のACTH(1-24)刺激に対するcAMPの反応は、野生型受容体発現細胞に比し、著しく低下している。

(3) 副腎ステロイド産生機構の基礎研究

副腎皮質の発生初期過程に関する研究

諸橋 憲一郎 九州大学大学院医学研究院 教授

【研究要旨】

転写因子Ad4BP/SF-1は副腎皮質におけるステロイドホルモン産生能を制御している。一方、本遺伝子のノックアウトマウスには副腎が形成されないこと、ならびに本遺伝子の強制発現マウスでは副腎形成が促進されることを考慮すると、本因子は単にステロイドホルモン産生に関与する遺伝子の制御を行っているだけではなく、副腎皮質細胞の分裂や増殖を制御していると推測される。しかしながら、本因子がどのようなメカニズムで細胞増殖を制御しているのかは不明である。この問題を明らかにするため、2011年度から副腎皮質における本因子の標的遺伝子の全体像を明らかにすることを目的に、次世代シーケンサーとクロマチン免疫沈降法による解析を行い、解糖系酵素遺伝子がAd4BP/SF-1の標的遺伝子となっていること示してきた。本年度においては、更に解析を押し進めた結果、本因子が細胞内のATPやNADPHなどの因子の産生を制御することで細胞増殖を制御していることを明らかにした。また、精巣ライディッヒ細胞においてもAd4BP/SF-1によって解糖系が制御されているらしいことが示されたことで、このような制御が全てのステロイドホルモン産生細胞で行われていることが強く示唆された。

A. 研究目的

Ad4BP/SF-1は核内受容体型転写因子であり、副腎皮質細胞において種々の遺伝子の転写を制御している。本研究では次世代シーケンサーとクロマチン免疫沈降法による解析で、Ad4BP/SF-1が制御する標的遺伝子の全体像を明らかにするとともに、本遺伝子のノックアウトマウスから副腎や生殖腺が消失する理由を明らかにすることを目的とした。昨年までに解糖系遺伝子がAd4BP/SF-1によって制御されることが示唆されたため、本年度は解糖系制御と細胞増殖の関係ならびに他のステロイドホルモン産生細胞において同様の制御が成立するかについて検討を行った。

B. 研究方法

前年度の実験ではAd4BP/SF-1のノックダウンで解糖系遺伝子発現の減少、ならびにグルコース消費の減少、中間代謝産物量の変化を確認した。今年度は、これらの物質量的変化と細胞増殖の関係を明らかにするため、副腎皮質由来のY-1細胞を用い、糖代謝の阻害剤の効果とAd4BP/SF-1のノックダウンの効果調べた。また、Ad4BP/SF-1による解糖系遺伝子の制御はY-1細胞において明らかにされたが、生体内のステロイド産生細胞でもこのような制御が行われているかどうかを調べるために、精巣ライディッヒ細胞を調整し、ChIP-sequence解析を行った。次世代シーケンサーによって得られた塩基配列情報は、九州大学生体防御医学研究

所の須山教授の研究グループとの共同研究のもとに解析した。

(倫理面への配慮)

本実験にはマウスを用いるが、全ての動物実験は九州大学動物実験指針に従って行なわれた。なお本研究は九州大学実験動物委員会の承認を得たものである。同様に組み替えDNA実験については、組み替えDNA実験委員会の承認を得たものである。

C. 研究結果

(1) 阻害剤の効果

解糖系ならびにペントースリン酸回路の阻害剤である2-デオキシグルコース(2DG)存在下でY-1細胞を培養したところ、細胞内ATPが70%程度に減少した。同程度の減少がsiAd4BP/SF-1を用いたノックダウンによって得られた。続いて、この条件下における細胞の増殖を調べたところ、2-DGによって細胞増殖は抑制され、その抑制はノックダウンの方が強かった。

以上の結果から、Ad4BP/SF-1は細胞内ATP産生に関与していること、また少なくとも細胞内ATP産生を通じ、細胞増殖の制御に関与していることが示唆された。

(2) ライディッヒ細胞におけるAd4BP/SF-1の結合

これまでの実験結果はAd4BP/SF-1が副腎皮質由来の培養細胞であるY-1細胞で得られた結果であった。培養細胞の特殊性を考えた場合、生体内でもこのようなAd4BP/SF-1による制御が行われているかは重要な点である。そこで、マウス精巣よりライディッヒ細胞を調製し、ChIP-sequence解析を行った。その結果、期待通りに解糖系遺伝子座にAd4BP/SF-1の結合が

認められた。

D. 考察

昨年度までの結果は、Ad4BP/SF-1が解糖系酵素遺伝子を制御していることを示すものであった。解糖系酵素はグルコースの分解により細胞内のエネルギー産生を、ひいては細胞の分裂や生存そのものを制御すると考えられる。そこで、Ad4BP/SF-1をノックダウンした細胞における細胞増殖の低下が解糖系の活性低下によるものか、Ad4BP/SF-1の解糖系以外の遺伝子発現の介したものは不明であった。本研究では阻害剤を使用することでATPならびにNADPHの細胞内濃度の変動と細胞増殖に対する影響を調べた。その結果、阻害剤によってAd4BP/SF-1ノックダウンとほぼ同等の影響が認められたことから、Ad4BP/SF-1のノックダウンによる解糖系制御の低下が細胞増殖の低下を引き起こしていると考えられた。

また、このようなAd4BP/SF-1の機能が他のステロイド産生細胞でも観察できるかを検討したところ、精巣ライディッヒ細胞においてもAd4BP/SF-1の解糖系遺伝子への結合が確認されたことから、Ad4BP/SF-1はこれらの細胞種では解糖系の制御に関わっていることが示唆された。

E. 結論

Ad4BP/SF-1はステロイド産生細胞において解糖系遺伝子の発現制御を通じ、細胞内ATP産生の制御を行っている。このような制御をもとに、細胞の生存と細胞特異的機能の活性化を制御していると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1, Glycolytic genes as the targets of a nuclear

- receptor Ad4BP/SF-1.
T Baba, H Otake, T Sato, K Miyabayashi, Y Shishido, C-Y Wang, Y Shima, H Kimura, M Yagi, Y Ishihara, S Hino, H Ogawa, M Nakao, T Yamazaki, D Kang, Y Ohkawa, M Suyama, B-Ch Chung, K Morohashi
Nature Commun. in press
- 2, Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes. Y Shima, K Miyabayashi, S Haraguchi, T Arakawa, H Otake, T Baba, S Matsuzaki, Y Shishido, H Akiyama, T Tachibana, K Tsutsui, K Morohashi
Mol Endocrinol 27, 63-73, 2013
 - 3, Steroid hormones and the development of reproductive organs K Morohashi, T Baba, M Tanaka
Sexual Development 7, 61-79, 2013
 - 4, Aristaless related homeobox gene, Arx, is implicated in mouse fetal Leydig cell differentiation possibly through expressing in the progenitor cells. K Miyabayashi, Y Katoh-Fukui, H Ogawa, T Baba, Y Shima, N Sugiyama, K Kitamura, K Morohashi
PLOS One 8, e68050, 2013
 - 5, Heterogeneity in sexual bipotentiality and plasticity of granulosa cells in developing mouse ovaries.
K Harikae, K Miura, M Shinomura, S Matoba, R Hiramatsu, N Tsunekawa, M Kanai-Azuma, M Kurohmaru, K Morohashi, and Y Kanai
J Cell Sci 126, 2834-2844, 2013
 - 6, Homeoproteins Six1 and Six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development.
Y Fujimoto, S Tanaka, Y Yamaguchi, H Kobayashi, S Kuroki, M Tachibana, M Shinomura, Y Kanai, K Morohashi, K Kawakami, and R Nishinakamura
Dev Cell 26, 416-430, 2013
2. 学会発表
(招待講演)
 - 1, Endocrine Society's 95th Annual Meeting, June 15-18, San Francisco Symposium
A Novel Landscape of Target Genes for Ad4BP/SF-1.
Ken-ichirou Morohashi
 - 2, 衛生環境・環境トキシコロジー学会 9月13-14日 福岡
特別講演 性差の内分泌制御と遺伝的制御
嶋雄一, 宮林香奈子, 大竹博之, 馬場崇, 諸橋憲一郎
 - 3, 第32回日本アンドロロジー学会
7月26-27日 大阪
特別講演 胎仔型ライディッヒ細胞の存在意義
嶋雄一, 宮林香奈子, 大竹博之, 馬場崇, 諸橋憲一郎
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

ステロイド産生細胞分化・再生に関する研究

分担研究者 宮本 薫 福井大学医学部分子生体情報学 教授

【研究要旨】

私どもは、ホルモン補充療法に変わりうる再生治療法の開発を目指し、間葉系幹細胞を副腎ステロイド産生細胞に転換することを試みている。昨年度は幹細胞からステロイド産生細胞への分化誘導系を用いて、新たなSF-1標的遺伝子としてGlutathione-S-transferase A (GSTA)遺伝子ファミリーを同定し、その発現調節機構を解析した。本年度は、SF-1と核内で複合体を形成する核タンパク質群を同定し、その中からC/EBP β に着目し解析を行い、ステロイドホルモン合成に対する役割を検討した。

A. 研究目的

副腎皮質ホルモン産生異常の治療には、主にホルモン補充療法が用いられているが、より生理的なホルモン動態を考慮すると外部からの投与によるホルモン補充療法にかわる自律的な分泌調節が可能な再生医療の開発が望まれる。私どもはこういった観点に立って、幹細胞からフィードバック機能を備えた副腎皮質ホルモン産生細胞の作製を試みている。骨髄間葉系幹細胞は成体から比較的容易に採取できること、さらにES細胞ほどではないにしろ様々な細胞に分化しうることから再生医療への応用に適した幹細胞である。本研究の目的は、骨髄間葉系幹細胞を用いて副腎皮質ホルモン産生細胞を創り出すと同時に、その分化メカニズムを分子レベルで明らかにすることである。本年度は、SF-1と核内で複合体を形成する核タンパク質群を同定し、その中からC/EBP β に着目して解析を行い、ステロイドホルモン合成に対する役割を検討した。

B. 研究方法

1) ヒト骨髄由来幹細胞株

hMSC-TERT-E6E7にFlagタグを付けたSF-1遺伝子を導入して、恒常的にSF-1を発現する細胞株を作製した。この細胞を大量培養したのち、核を単離し0.1M NaCl存在下にMNuclease処理を行って核タンパク質複合体を生理的条件下で抽出した。SF-1タンパク質複合体を、イムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、複合体構成タンパク質をSDS-PAGEにより分離したのち、MALDI-TOF MS/MSにより同定した。

2) 上記解析により同定された20種類余りのSF-1複合体構成タンパク質の中からC/EBP β に焦点を合わせ、ステロイドホルモン合成酵素のHSD3B2およびCYP11A1遺伝子上流に対するC/EBP β の結合をEMSAにより解析した。さらに染色体免疫沈降法により、これらのステロイドホルモン合成酵素遺伝子上流域に存在するC/EBP β 結合領域を解析した。さらにルシフェラーゼアッセイにより、これらの

遺伝子発現におけるC/EBP β の関与を解析した。

- 3) ステロイドホルモン合成におけるC/EBP β の役割を明らかにするため、KGN細胞を用いて、cAMP刺激下でのプロゲステロン産生を、C/EBP β のノックダウンにより解析した。
- 4) cAMPの刺激によるC/EBP β とSF-1との結合の変化を、免疫沈降法により解析した。

C. 研究結果

- 1) hMSC-TERT-E6E7にFlagタグを付けたSF-1遺伝子を導入し、恒常的にSF-1を発現する細胞株を樹立した。その細胞の核抽出物からSF-1複合体をイムノアフィニティークロマトにより単離精製した。通常の核タンパク質抽出法では、イオン強度が高すぎるため複合体が解離してしまい単離精製できなかったが、生理的イオン強度でmungbean nuclease(MNuclease)を用いることで温和な条件下でSF-1複合体の抽出に成功した。磁気ビーズを利用したSF-1イムノアフィニティークロマトによりSF-1複合体を単離し、SDS-PAGEにより20種類以上の複合体構成タンパク質を分離することができた。各構成タンパク質をSDS-PAGEより抽出しMALDITOF-MS/MSにより同定した。そのうちの一つにC/EBP β が同定されたことから、本年度はこれを中心に解析した。
- 2) C/EBP β はHSD3B2遺伝子上流4kb付近に強く結合することを、ChIP-on-chip assayおよび染色体免疫沈降法により明らかに

した。さらにEMSA assayにより詳しくその結合サイトを解析した結果、HSD3B2遺伝子上流-4068bp~-4038bpにC/EBP β およびSF-1が協調的に結合することを明らかにした。さらにこれらの結合はcAMP刺激により増強されることも明らかとなった。

同様にCYP11A1遺伝子上流2kb付近に新たなC/EBP β 結合サイトを同定した。EMSA assayによるさらに詳細な解析により、C/EBP β はCYP11A1遺伝子上流-1,961~-1,939 bpに結合することが明らかとなった。ルシフェラーゼアッセイにより、この結合サイトを含む遺伝子上流2kbが、CYP11A1遺伝子発現に必須であることを明らかにした。

- 3) siRNAを用いてC/EBP β のノックダウンによる影響を解析した。まずStAR, HSD3B2, CYP11A1各遺伝子の発現に対する影響をルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果、いずれの遺伝子発現もcAMP刺激下の条件では50%~70%減少した。これを反映して、KGN細胞からのcAMP刺激によるプロゲステロン産生は、C/EBP β のノックダウンにより抑制された。
- 4) C/EBP β とSF-1の結合を免疫沈降法により解析した結果、cAMP刺激により、C/EBP β とSF-1との結合は著しく増強されることが明らかとなった。

D. 考察

本年度の研究により、SF-1複合体の単離精製に成功した。核タンパク質の抽出には、DNAと核タンパク質との静電的相互作用を打

ち消すため、一般的に高イオン強度の抽出溶液が用いられる。しかしこの抽出条件下ではSF-1と相互作用する複合体構成タンパク質はSF-1と解離してしまい、複合体として回収できない。そこで、本研究ではDNAをMNucleaseにより分解し、核タンパク質との静電的相互作用を消滅させることで、生理的条件下でSF-1複合タンパク質の単離精製に成功した。複合体構成タンパク質を解析したところ、RNA結合タンパク質やクロマチンリモデリングに関与するタンパク質などが同定されたが、本研究ではステロイドホルモン合成と関連の深いことが示唆されているC/EBP β に焦点を合わせ解析した。これまでの報告ではC/EBP β はSF-1と協調してStAR遺伝子の転写を促進し、ステロイドホルモン合成に関与すると考えられているが、本研究でC/EBP β はStAR遺伝子だけでなくHSD3B2遺伝子およびCYP11A1遺伝子の転写も促進していることが明らかとなった。また、HSD3B2遺伝子上流4kb付近およびCYP11A1遺伝子上流2kb付近に存在する新たなC/EBP β 結合サイトがそれぞれの遺伝子の転写に重要であり、SF-1と協調することでステロイドホルモン合成に関与していることが明らかとなった。

E. 結論

SF-1を恒常的に発現している間葉系幹細胞から、SF-1複合体タンパク質を単離精製した。その構成タンパク質の一つとして同定したC/EBP β の解析から、C/EBP β はSF-1と協調して、ステロイドホルモン合成関連遺伝子群の転写を促進し、特にトロピックホルモンの情報伝達系であるcAMP刺激下においてステロイドホルモン合成を促進することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Orisaka, M., Hattori, K., Fukuda, S., Mizutani, T., Miyamoto, K., Sato, T., Tsang, B.K., Kotsuji, F., Yoshida, Y.: Dysregulation of ovarian follicular development in female rat: LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. *Endocrinology* 154(8), 2870-2880, 2013.
 - 2) Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Shimada, M., Kitano, T., Umezawa, A., Miyamoto, K. : Androgen/Androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 369, 42-51, 2013.
 - 3) Kawabe, S., Yazawa, T., Kanno, M., Usami, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Orisaka, M., Miyamoto, K. : A novel isoform of liver receptor homolog-1 is regulated by steroidogenic factor-1 and the specificity protein family in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 154(4), 1648-1660, 2013.
 - 4) Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K. : Transcriptional regulation of human ferredoxin 1 in ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 370, 1-10, 2013.
 - 5) Matsumura, T., Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Ayabe, T., Katsumata, N., Fukami, M., Inatani, M., Akagi, Y., Umezawa, A., Ogata, T., Miyamoto, K. : Human glutathione S-transferase A (GSTA) family genes are

regulated by steroidogenic factor 1 (SF-1) and are involved in steroidogenesis. The FASEB Journal 27(8), 3198-3208, 2013.

- 6) Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K. : Transcriptional regulation of human ferredoxin reductase through an intronic enhancer in steroidogenic cells. BBA - Gene Regulatory Mechanisms 1839(1), 33-42, 2014.

2. 学会発表

(シンポジウム)

- 1) 水谷哲也, 宮本薫 : GSTAファミリーのクロマチン構造の変化を介した転写制御とステロイド産生に対する役割. シンポジウム17 卵胞発育・排卵・卵成熟の調節機構の分子メカニズム. 第86回日本内分泌学会学術総会. 仙台市, 2013,4,25-27.

(一般演題)

- 1) 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野直史, 水谷哲也, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 宮本薫 : 卵巣顆粒膜細胞におけるアンドロゲンによるCox-2の発現制御機構. 第86回日本内分泌学会学術総会. 仙台市, 2013,4,25-27.
- 2) 河邊真也, 矢澤隆志, 菅野直史, 宇佐美陽子, 水谷哲也, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 宮本薫 : 卵巣顆粒膜細胞におけるLRH-1のプロモーター解析. 第86回日本内分泌学会学術総会. 仙台市, 2013,4,25-27.
- 3) 松村健大, 今道力敬, 水谷哲也, 具云峰, 矢澤隆志, 菅野直史, 河邊真也, 宮本薫 : ステロイドホルモン産生細胞におけるAlpha class GSTの転写制御. 第86回日

本内分泌学会学術総会. 仙台市, 2013,4,25-27.

- 4) 今道力敬, 水谷哲也, 具云峰, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野直史 : 卵巣顆粒膜細胞におけるFDX1遺伝子の転写制御. 第86回日本内分泌学会学術総会. 仙台市, 2013,4,25-27.
- 5) 水谷哲也, 松村健大, 今道力敬, 具云峰, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 宮本薫 : SF-1によるGlutathione S-transferase(GST)A familyの転写制御機構. 第31回内分泌代謝学サマーセミナー. 由布市(大分県), 2013,7,11-13.
- 6) 矢澤隆志, 谷口隆信, 宮本薫 : 幹細胞からの副腎・生殖腺のステロイドホルモン産生細胞の作製. 第31回内分泌代謝学サマーセミナー. 由布市(大分県), 2013,7,11-13.
- 7) 河邊真也, 矢澤隆志, 菅野真史, 水谷哲也, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 宮本薫 : 卵巣顆粒膜細胞におけるSF-1/LRH-1経路を介した転写制御機構. 第31回内分泌代謝学サマーセミナー. 由布市(大分県), 2013,7,11-13.
- 8) 今道力敬, 水谷哲也, 具云峰, 松村健大, 河邊真也, 菅野真史, 矢澤隆志, 宮本薫 : Ferredoxin 1の性腺特異的転写制御機構. 第31回内分泌代謝学サマーセミナー. 由布市(大分県), 2013,7,11-13.
- 9) 水谷哲也, 松村健大, 今道力敬, 河邊真也, 宮本薫 : 新たなステロイド代謝酵素GSTAファミリーの転写調節機構. 第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会. 千里, 2013,11,22-23.
- 10) 水谷哲也, 具云峰, 今道力敬, 河邊真也, 矢澤隆志, 尾崎司, 南野直人, 宮本薫 : SF-1複合体構成因子C/EBP β のプロ

ゲステロン産生に対する役割. 第18回日本生殖内分泌学会学術集会. 東京, 2013,12,7.

- 11) 今道力敬, 矢澤隆志, 河邊真也, 向井邦晃, 折坂誠, 水谷哲也, 宮本薫: ヒト生殖腺における新たなアンドロゲン代謝機構. 第18回日本生殖内分泌学会学術集会. 東京, 2013,12,7.
- 12) 松村健大, 今道力敬, 水谷哲也, 具云峰, 矢澤隆志, 菅野直史, 河邊真也, 宮本薫: ステロイドホルモン産生細胞におけるGSTAファミリーの転写制御と機能. 第18回日本生殖内分泌学会学術集会. 東京, 2013,12,7.
- 13) 矢澤隆志, 谷口隆信, 宮本薫: 卵巣・顆粒膜細胞におけるARによるCox-2の発現調節機構. 第18回日本生殖内分泌学会学術集会. 東京, 2013,12,7.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 (出願中)

特願2013-156672

卵子の受精可能性の検査のためのバイオマーカーおよびそれを用いた判定

副腎皮質細胞におけるmelanocortin 2 receptor accessory protein (MRAP)

遺伝子の発現は転写因子 AP1 により制御される

研究分担者 岩崎 泰正 高知大学保健管理センター
研究協力者 西山 充 高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
田口 崇文 高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
次田 誠 高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
中山 修一 高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
岡崎 瑞穂 高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科

【研究要旨】

副腎皮質束状層において ACTH 受容体である melanocortin receptor type 2 (MC2R) が機能するには、受容体関連蛋白 (melanocortin 2 receptor accessory protein; Mrap) の存在が必須である。今回私どもは、ヒトMrap 遺伝子(MRAP)の転写調節領域をクローニングし、ヒト副腎皮質由来H295R 細胞において、その転写調節機構を検討した。その結果、MRAP遺伝子の5'上流側に、AP1 (Fos/Jun) および NFATの結合配列を認めた。副腎皮質細胞で細胞外刺激により誘導される転写因子のうち、Egr1, Nurr1, Nur77 の共発現は、MRAP遺伝子の転写活性に影響を及ぼさなかったが、AP1 (Fos/Jun)の共発現は強力（10倍以上）に促進した。Ca⁺反応性転写因子NFATも有意の発現誘導効果を示した。AP1 は MAPKシグナルや炎症刺激で発現が誘導される転写因子であること、NFATはカルシウムシグナルで活性化される転写因子であることを考慮すると、ストレスや炎症時の ACTH 依存性グルココルチコイド産生に、Mrap が促進的に作用している可能性が示唆された。

A. 研究目的

副腎皮質束状層および球状層では ACTH 受容体である melanocortin receptor type 2 (MC2R) が発現している。近年の研究により、この MC2Rが機能する際に、受容体関連蛋白 (melanocortin 2 receptor accessory protein; Mrap) の存在が必須であることが明らかにされた。実際、ヒト MRAP 遺伝子に変異が生じると ACTH 不応症による副腎不全を来することが明らかにされている (Metherell LA, et al. Nat

Genet 2005)。この事実は、Mrap が副腎ステロイド合成の1つの調節段階として、副腎皮質の機能調節に関与している可能性を強く示唆している。そこで今回私どもは、ヒトMRAP 遺伝子の5'側転写調節領域をクローニングし、ヒト副腎皮質由来H295R 細胞を用いて、その転写調節機構を検討した。

B. 研究方法

DMEM/F12培地で培養したヒト副腎皮質由

来 H295 細胞に、ヒトゲノムよりクローニングした MRAP 遺伝子転写調節領域 (約2 kb) と luciferase レポーター遺伝子との結合プラスミドを一過性に導入した。この条件下において、各種シグナル伝達因子の共発現が MRAP 遺伝子転写活性に及ぼす効果を評価した。また炎症や細胞内 Ca^{++} の上昇に応答して活性化される転写因子 [AP1 (Fos/Jun)、NFAT] 共発現の効果も併せて解析した。

C. 研究結果

- 1) ヒト MRAP 遺伝子の 5' プロモーター上に典型的な AP1 (Fos/Jun) および NFAT 結合配列を認めた (図 1)。
- 2) 各種シグナル伝達因子のうち、cAMP/PKA の活性化 (forskolin 刺激, PKA catalytic subunit の共発現) は MRAP 遺伝子の転写活性を約 2-7 倍増加させた。しかし CREB の過剰発現は効果を認めなかった。
- 3) 副腎皮質束状層で各種ステロイド合成酵素遺伝子の転写に関与する誘導型転写因子 NGFIA (Egr1)、NGFIB (Nur77) および Nurr1 の共発現は、MRAP 遺伝子の転写活性に影響を及ぼさなかった。
- 4) 一方、 Ca^{++} 応答性転写因子 NFAT の共発現は、MRAP 遺伝子の転写活性を約 3 倍に、AP1 (Fos/Jun) の共発現は約 13-14 倍に増強した (図 2)。炎症関連転写因子 NF- κ B (p65/p50) の共発現は効果を示さなかった。

D. 考案

副腎皮質束状層の糖質コルチコイド (ヒトではコルチゾール) は下垂体 ACTH の支配下にあり、ACTH の欠損ないし作用障害 (MC2R 遺伝子変異) により副腎不全を来すことは良く知られている。しかし MC2R 遺伝子に変異が存

在しない場合でも ACTH 不応症を呈する例が存在すること、また血中 ACTH 値とコルチゾール値に時に乖離が存在する病態の存在も明らかにされており、ACTH が副腎で作用するレベルにおいて、何らかの調節段階が存在する可能性は以前から指摘されていた。

2005 年に、MC2R 受容体が機能するには accessory protein (Mrap) の存在が必要であること、またその遺伝子変異により ACTH 不応状態となることが報告された。そこで今回私どもは、Mrap の発現状態が副腎の ACTH 応答性を規定する 1 つの調節段階である可能性を考慮し、ヒト MRAP 遺伝子の転写調節領域をクローニングして、その発現に関与するシグナル伝達系や転写因子の同定を試みた。その結果、興味深いことに、束状層で CYP11B1 などを制御する核内受容体 Nur77 などの共発現はほとんど効果を示さなかったのに対し、細胞興奮に伴う細胞内 Ca^{++} 上昇で活性化される転写因子 (NFAT) や、MAPK シグナル伝達系で誘導される転写因子 (Fos/Jun) が MRAP 遺伝子の発現を促進することが明らかとなった。特に後者においては、強力な誘導効果が認められた。

AP1 (Fos/Jun) は immediate early gene に属し、神経細胞では脱分極時に発現が誘導されることから、細胞興奮の指標として用いられている。しかし非神経細胞でも、MAPK シグナル伝達系の活性化や細胞内 Ca^{++} の上昇、あるいは炎症刺激により発現が誘導されることが知られている。非誘導型転写因子 NFAT も、同様に細胞内 Ca^{++} の上昇で活性化される。今回の私どもの結果より、副腎コルチゾール産生細胞において ACTH 刺激に伴う細胞内 Ca^{++} 上昇や MAPK 系の活性化が、これらの転写因子を誘導ないし活性化し、MRAP 遺伝子の発現を招来することで MC2R の機能を保持し、持続的な ACTH 作用を維持する機序の存在が示唆された。

副腎皮質束状層のコルチゾール産生は炎症や外傷などのストレス時に増加し、その分泌は、血中 ACTH濃度がコルチゾールのネガティブフィードバック作用によって低下した後も、ある持続することが知られている。今回の私どもの結果より、持続的なストレスや炎症の存在下では、同時に発現したMrapがMC2R の脱感作を防止すると同時に、MR2R と下流のシグナル伝達系との共役を維持させることにより、慢性的なストレスに対応したコルチゾール産生を状態を維持しているものと推察される。

クッシング病では、慢性的な高ACTH血症下でもMC2Rの脱感作が生じることなくコルチゾール産生が持続することも知られている。今回の結果より、その病態に MC2R由来のMAPK シグナルに起因するMrapの発現亢進が関与する機序の存在が示唆される。その意味で、今回の私どもの研究成果は、MC2R自体の阻害のみならず、Mrapの阻害、ないしMRAP遺伝子の発現を制御するAP1の阻害が、Cushing病の病態を改善させる可能性を示唆している。

E. 結論

ヒト副腎皮質由来H295R 細胞において、MC2Rの機能に必須の蛋白Mrapの遺伝子発現に、転写因子AP1および NFATが重要な役割を果たしていることを明らかにした。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表・著書

- 1) 岩崎泰正. 尿崩症. 今日の治療指針 医学書院 (東京) 2013, p689-690.
- 2) 岩崎泰正. アクロメガリーと合併症. Acropegaly Handbook. メディカルレ

ビュー社. 2013, p 143-145.

- 3) 岩崎泰正. 症状・身体所見とホルモン分泌・作用機序との関連. 特別増刊号「内分泌ホルモンのすべて」. 内分泌・糖尿病・代謝内科 2013; Suppl 4:22-30.
- 4) 岩崎泰正. 中枢性尿崩症. 特集「内分泌疾患に強くなる」. Medicina 2013; 50: 1802-1805.
- 5) 綿貫裕, 高安忍, 蔭山和則, 岩崎泰正, 須田俊宏, 大門眞. ヒトメラノーマHMV-II細胞におけるCRH及びurocortin 1による tyrosinase-related protein 1遺伝子発現作用機序についての検討. ACTH RELATED PEPTIDES 24:18-20;2013.
- 6) 蔭山和則, 山形聡, 岩崎泰正, 井樋慶一. 視床下部CRF遺伝子発現における FosB蛋白の関与について - in vivo の検討 - . ACTH RELATED PEPTIDES 24;21-22;2013.
- 7) 西山充, 次田誠, 中山修一, 岡崎瑞穂, 田口崇文, 岩崎泰正, 辛島尚, 執印太郎, 寺田典生. 片側副腎腫瘍摘除により糖尿病の改善が得られたAIMAHの1例. ACTH RELATED PEPTIDES 24;24-26;2013.
- 8) Miyake Y, Tanaka K, Nishikawa T, Naruse M, Takayanagi R, Sasano H, Takeda Y, Shibata H, Sone M, Satoh F, Yamada M, Ueshiba H, Katabami T, Iwasaki Y, Tanaka H, Tanahashi Y, Suzuki S, Hasegawa T, Katsumata N, Tajima T, Yanase T. Prognosis of primary aldosteronism in Japan: results from a nationwide epidemiological study. Endocr J 2013, ePub.
- 9) Lee HA, Lee DY, Cho HM, Kim SY, Iwasaki Y, Kim IK. Histone deacetylase inhibition attenuates transcriptional activity of mineralocorticoid receptor through its

acetylation and prevents development of hypertension. *Circ Res* 2013;112: 1004–1012.

- 10) Amano E, Nishiyama M, Iwasaki Y, Matsushima S, Oguri H, Fukuhara N, Nishioka H, Yamada S, Inoshita N, Fukaya T, Terada Y. Remarkable Cystic Expansion of Microprolactinoma Causing Diabetes Insipidus during Pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2575–2576.
 - 11) Kageyama K, Itoi K, Iwasaki Y, Niioka K, Watanuki Y, Yamagata S, Nakada Y, Das G, Suda T, Daimon M. Stimulation of corticotropin-releasing factor gene expression by FosB in rat hypothalamic 4B cells. *Peptides*. 2013;51C:59–64. *Peptides* 2013 Epub.
 - 12) Watanuki Y, Takayasu S, Kageyama K, Iwasaki Y, Sakihara S, Terui K, Nigawara T, Suda T. Involvement of Nurr-1/Nur77 in corticotropin-releasing factor/urocortin1-induced tyrosinase-related protein 1 gene transcription in human melanoma HMV-II cells. *Mol Cell Endocrinol* 2013;370:42–51.
2. 学会発表
- 1) Tsukamoto N, Otsuka F, Ogura-Ochi K, Inagaki K, Nakamura E, Toma K, Terasaka T, Iwasaki Y, Makino. Inhibitory effects of melatonin on adrenocortico-tropin production via BMP-4 activation by pituitary corticotrope cells. The 95th Annual Meeting of the Endocrine Society. 2013, June 14–18. San Francisco, USA.
 - 2) Ogura-Ochi K, Otsuka F, Tsukamoto N, Miyoshi T, Nakamura E, Takeda M, Inagaki K, Ogura T, Iwasaki Y, Makino H. Regulatory Role of Melatonin and BMP-4 in Prolactin Secretion by Rat Pituitary Lactotrope Cells. The 94th Annual Meeting of the Endocrine Society. 2012, June 23–26. Houston, USA.
 - 3) Saito-Hakoda A, Uruno A, Shimizu K, Kudo K, Saito-Ito T, Yoshikawa T, Matsuda K, Fujiwara I, Kagechika H, Iwasaki Y, Ito S, Sugawara A. Retinoid X Receptor Agonists Differentially Affect Proliferation, Apoptosis, and ACTH Secretion/POMC Gene Expression in AtT20 Corticotroph Cells. The 94th Annual Meeting of the Endocrine Society. 2012, June 23–26. Houston, USA.
 - 4) Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Okazaki M, Nakayama S, Ema H, Terada Y, Kambayashi M, Kawamura K. Role of Ca-dependent transcription factor NFAT in the regulation of CYP11B2 gene. The 15th International Congress on Hormonal steroids and Hormones & cancer. 2012, November 15–17, Kanazawa, Japan
 - 5) 岩崎泰正, 西山充, 田口崇文, 次田誠, 岡崎瑞穂, 中山修一, 江間宏樹, 寺田典生, 神林真知子, 川村和夫。副腎皮質アルドステロン合成酵素 (CYP11B2) 遺伝子発現における転写因子NFATの関与。第20回日本ステロイドホルモン学会学術集会。2012年11月18日。金沢市。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし